



⑬ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

Offenlegungsschrift DE 197 39 120 A 1

⑲ Aktenzeichen: 197 39 120.6
⑳ Anmeldetag: 6. 9. 97
㉑ Offenlegungstag: 11. 3. 99

⑤ Int. Cl.⁶:
G 01 N 31/22
G 01 N 21/78
G 01 N 1/28
B 01 L 3/00
// G 01 N 21/64, 21/76,
33/02, 33/49

DE 197 39 120 A 1

⑦ Anmelder:

Friedrich-Schiller-Universität Jena, 07743 Jena, DE

⑧ Erfinder:

Horn, Anton, Prof. Dr., 07749 Jena, DE; Marqui, Carlos Pascual, 07743 Jena, DE; Reinhart, Konrad, Prof. Dr.med.habil., 07743 Jena, DE; Poppitz, Elke, Dipl.-Chem., 07745 Jena, DE; Bethge, Mathias, Dipl.-Ing., 07745 Jena, DE; Borkowski, Annett, 07407 Rudolstadt, DE

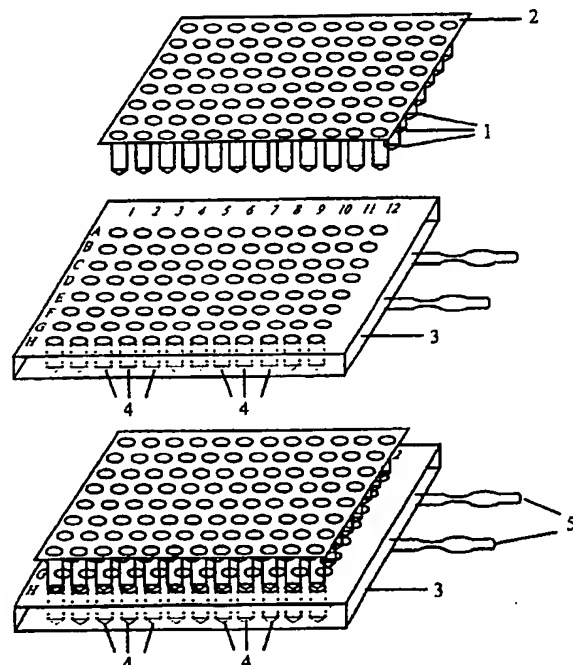
Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

④ Verfahren zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von Proben

⑤ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von Proben und wird insbesondere in der Biochemie, in der Biotechnologie, in der medizinischen und industriellen Forschung sowie in der Lebensmittelchemie eingesetzt.

Aufgabe ist es, die Antioxidanzkapazität von Proben auf möglichst einfache Weise, schnell und insbesondere ohne zeitaufwendige Analysen zu bestimmen.

Erfindungsgemäß werden aus den Proben in einer Pluralität von in einem vorgegebenen x-y-Raster angeordneten gekühlten Analysengefäßen Mischungen hergestellt, die weiterhin zumindest jeweils aus einem System, welches temperaturabhängig freie Radikale bildet, und einem Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, bestehen. Die Mischungen werden in den gekühlten Analysengefäßen (1) zunächst auf eine im wesentlichen gleiche Ausgangstemperatur zwischen 0 und ca. 20°C gebracht und danach gleichmäßig auf eine Temperatur bis höchstens ca. 90°C erwärmt. Die Erwärmung erfolgt vorteilhaft über einen heizbaren metallischen Grundkörper (3), auf dem eine Mikrotiterplatte (2) mit formnachgiebigen Analysengefäßen (1) im x-y-Raster aufsetzt. Während der Temperaturerhöhung werden mit einer an sich bekannten Readeranordnung in den Mischungen der zeitliche Verlauf der Änderung der optischen Eigenschaften erfaßt sowie daraus die Antioxidanzkapazität durch Vergleich mit bekannten Referenzwerten bestimmt.



DE 197 39 120 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von Proben und wird insbesondere in der Biochemie, in der Biotechnologie, in der medizinischen und industriellen Forschung sowie in der Lebensmittelchemie eingesetzt.

Freie Radikale treten in der belebten Natur in einer großen stofflichen Vielfalt mit kurzen, stark verschiedenen Lebenszeiten und unterschiedlicher Bedeutung auf. Einerseits sind sie gefährliche Beiprodukte, die im Prozeß der biologischen Oxidation gebildet werden und in der Lage sind, nahezu alle biologischen Stoffgruppen chemisch zu modifizieren, sowie zu schädigen. Andererseits werden sie wegen ihrer herausragenden Reaktionsfreudigkeit von der Natur als hilfreiche Werkzeuge zur Bekämpfung von in den Organismus eingedrungenen Schädlingen durch spezialisierte Zellen, wie Leukozyten und Makrophagen, im Prozeß der Infektionsbekämpfung gebildet und eingesetzt. Es besteht ein kompliziert ausgewogenes Gleichgewicht von im Organismus gebildeten Oxidantien und der geregelten Bildung von Antioxidantien. Oxidativer Streß wird durch Antioxidantien, welche sich aus niedermolekularen wasser- oder lipidlöslichen Substanzen wie Vitamin C, Glutathion, Harnsäure, Bilirubin, Vitamin E, Vitamin A u. a. rekrutieren kompensiert oder durch enzymatische Prozesse, wie Superoxid-Dismutase, Katalase, Glutathionreduktase und Glutathionperoxidase, unwirksam gemacht.

Störungen in der Antioxidanzbalance werden für die pathobiochemischen Mechanismen der Entstehung des Diabetes mellitus, und seiner Symptomatik (Ceriello A., Bortolotti N., Falsetti E., Taboga C., Tonutti L., Crescentini A., Motz E., Lizzio S., Russo A., Bartoli E. Total radical-trapping antioxidant parameter in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997; 20: 194-197), für die schwere Symptomatik der Sepsis (Dasgupta A., Malhotra D., Levy H., Marcadis D., Blackwell W., Johnston D., Decreased total antioxidant capacity but normal lipid hydroperoxide concentrations in sera of critically ill patients. *Life Sci* 1996; 60: 4-5 oder auch Cowley H. C., Bacon P. J., Goode H. F., Webster N. R., Jones J. G., Menon D. K. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med* 1996; 24: 1179-1183), für Arteriosklerose und Herzinfarkt (Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: An update. *Annals of Clin and Lab Science* 1997; 27: 1-10 oder Miller N. J., Rice-Evans C. A. Antioxidant activity of resveratrol in red wine. *Clin-Chem.* 1995; 41: 1789 oder auch Mulholland C. W., Strain J. J. Serum total free radical trapping ability in acute myocardial infarction. *Clin-Biochem.* 1991; 24: 437-441), für wesentliche Probleme im Prozeß des Alterns (Butterfield D. A., Howard B. J., Yatin S., Allen K. L., Carney J. M. Free radical oxidation of brain proteins in accelerated senescence and its modulation by N-tert-butyl-alpha-phenylnitron. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94: 674-678.), für Nierenerkrankungen (Rohrmoser M. M., Mayer G. Reactive oxygen species and glomerular injury. *Kidney Blood - Press-Res.* 1996; 19: 263-269 oder McGrath L. T., Douglas A. F., McClean E., Brown J. H., Doherty C. C., Johnston G. D., Archbold G. P. Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. *Clin-Chim-Acta.* 1995; 235: 179-188 oder auch Jackson P., Loughrey C. M., Lightbody J. H., McNamee P. T., Young I. S. Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clin-Chem.* 1995; 41: 1135-1138.), für die Entstehung von neurodegenerativen Prozessen (Borlongan C. V., Kanning K., Poulos S. G., Freeman T. B., Cahill D. W., Sanberg P. R. Free radical da-

mage and oxidative stress in Huntington's disease. *J-Fla-Med-Assoc.* 1996; 83: 335-341 oder Gurney M. E.; Cutting F. B.; Zhai P.; Andrus P. K.; Hall E. D. Pathogenic mechanisms in familial amyotrophic lateral sclerosis due to mutation of Cu, Zn superoxide dismutase. *Pathol-Biol-Paris.* 1996; 44: 51-56), und für die Entstehung einiger Arten von Karzinomen (Dreher D.; Junod A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur-J-Cancer.* 1996; 32A: 30 38 oder Pappalardo G.; Guadalupe A.; Maiani G.; Illomei G.; Trifero M.; Frattaroli F. M.; Mobarhan S. Antioxidant agents and colorectal carcinogenesis: role of beta-carotene, vitamin E and vitamin C. *Tumori.* 1996; 82: 6 11 oder auch Kumar K.; Thangaraju M.; Sachdanandani P. Changes observed in antioxidant system in the blood of postmenopausal women with breast cancer. *Biochem-Int.* 1991; 25: 371-380) verantwortlich gemacht.

Die Bestimmung der Antioxidanzkapazität oder Antioxidanzreaktivität als diagnostisch-analytischer Parameter erhält in der Medizin für die Diagnostik und zur Verlaufskontrolle für eine Vielzahl von Erkrankungen zunehmend größere Bedeutung.

Wayner und Mitarbeiter (Wayner D. D., Burton G. W., Ingold K. U., Barclay L. R., Locke S. J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-419) waren die ersten, die 1987 eine Methode zur Bestimmung des Totalen Radical Antioxidanz Potentials (TRAP) eingeführt haben. In einem System, das aus einer Radikalquelle 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP) bestand, welche bei gleichbleibender Temperatur über eine konstante Radikalbildungsrate eine Lipidmischung oxidierte, wurde die Sauerstoffkonsumption gemessen. Nach Zusatz von Antioxidantien wurde die Induktionszeit des Systems bis zum erneuten Sauerstoffverbrauch bestimmt, sowie mit einem Referenzantioxidanz bekannter Stöchiometrie und Reaktivität verglichen und kalibriert. In der Folgezeit sind sowohl andere Radikalquellen als auch andere Radikalindikatorsysteme adaptiert und optimiert worden (Lissi E.; Salim-Hanna M.; Pascual C.; del-Castillo M. D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. *Free-Radic-Biol-Med.* 1995; 18: 153-158 oder Cao G.; Alessio H. M.; Cutler R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1994; 16: 135-137 oder auch Candy TEG, M Hodgson, P Jones 1990. Kinetics and mechanisms of a chemiluminescent clock reaction based on the horseradish peroxidase catalysed oxidation of luminol by hydrogen peroxide. *J. Chem. Soc Perkin Trans 2:* 1385-1388). Weitere Veröffentlichungen hierzu sind beispielsweise Uotila J. T.; Kirkkola A. L.; Rorarius M.; Tuimala R. J.; Metsa-Ketela T. The total peroxyl radical-trapping ability of plasma and cerebrospinal fluid in normal and preeclamptic parturients. *Free-Radic-Biol-Med.* 1994; 16: 581-590 oder Whitehead T. P., GHG Thorpe, SRJ Maxwell. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analyt. Chimica Acta* 1992; 266: 265-277 oder DeLange R. J.; Glazer A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents. *Anal-Biochem.* 1989; 177: 300-306 oder auch Thurnham D. I.; Singkamani R.; Kaewichit R.; Wongworapat K. Influence of malaria infection on peroxyl-radical trapping capacity in plasma from rural and urban Thai adults. *Br-J-Nutr.* 1990; 64: 257-271.

Neben diesen Methoden, die in den zu charakterisierenden Proben nach längerer oder kürzerer Verzögerung die Induktion eines durch die Präsenz einer Radikalquelle ausge-

lösten Signals messen, sind Verfahren beschrieben worden, die mit Einmalmessungen nach einer bestimmten Zeit auskommen. Der Nachteil der bisher bekannten Methoden besteht darin, daß sie zeitaufwendig und sequentiell durchgeführt werden müssen.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zu Grunde, die Antioxidanzkapazität von Proben auf möglichst einfache Weise, schnell und insbesondere ohne zeitaufwendige Analysen zu bestimmen.

Die Nachteile der bekannten Lösungen werden erfindungsgemäß dadurch umgangen, daß die Analysen parallel in Sätzen von Pluralitäten von Mischungen durchgeführt werden, wobei jede Einzelmessung im Verbund von sonst gleichen Randbedingungen durchgeführt wird. Die Synchronisation und Dosierung der Radikalbildung erfolgt durch programmierte Temperaturerhöhung mit geeigneten erfindungsgemäßen Mitteln. Die automatisierte Auswertung erfolgt über mitgeführte und ansonsten wie die Probe gleichbehandelte Kalibratoren.

Die Erfindung soll nachstehend anhand von in den Zeichnungen dargestellten Ausführungsbeispielen näher erläutert werden.

Es zeigen:

Fig. 1 Probenanordnung der auf einem beheizbaren Grundkörper angebrachten Analysengefäße (Wells) in einem 12×8 -Raster einer Mikrotiterplatte;

Fig. 2 zeitlicher Temperaturverlauf zur definierten simultanen Erhöhung der Temperatur in den im 12×8 -Raster angeordneten Analysengefäßen in einem Zeitraum von 8 Minuten;

Fig. 3 Temperaturverlauf der Mischungen in drei ausgewählten Analysengefäßen der Mikrotiterplatte;

Fig. 4 Auswertung der Analysenergebnisse;

Fig. 5 zeitlicher Verlauf der Absorption von ABTS bei 620 nm mit der Radikalquelle ABAP in allen 96 Wells einer Mikrotiterplatte mit unterschiedlichen Proben über einen Zeitraum von 43 Minuten;

Fig. 6 zeitlicher Verlauf der Absorption von ABTS bei 620 nm mit Harnsäure und Catechin als zu untersuchende Proben über einen Zeitraum von 43 Minuten;

Fig. 7 Eichkurve von Trolox als Referenzantioxidanz für die colorimetrische Bestimmung der Antioxidanzkapazität mit ABAP/ABTS;

Fig. 8 zeitlicher Verlauf der Chemilumineszenz von Luminol mit ABAP als Radikalquelle in einer Matrix von 6X8 Analysengefäßen mit unterschiedlichen Proben in einem Zeitraum von 25 Minuten;

Fig. 9 Einfluß der Zugabe von zusätzlichem Trolox zur Reaktionsmischung auf den Verlauf der Chemilumineszenz von ABAP/Luminol. (H3 ohne Trolox, G4 und H4 mit Trolox in der Reaktionsmischung);

Fig. 10 zeitlicher Verlauf der Absorption bei 620 nm eines Zellsystems (Resistenz von Erythrozyten gegenüber ABAP in Gegenwart unterschiedlicher Trolox-Konzentrationen) innerhalb eines Zeitraumes von 4 Stunden;

Fig. 11 Eichkurve von Trolox als Referenzantioxidanz (Resistenz eines Zellsystems);

Fig. 12 zeitlicher Verlauf der Chemilumineszenz von Luminol im System Xanthin-Xanthinoxidase;

Fig. 13 Kalibrierung der Xanthin-Xanthinoxidase-Chemilumineszenzmethode mit Superoxid-Dismutase als Referenzantioxidanz;

Fig. 14 zeitlicher Verlauf der Chemilumineszenz von Luminol im System H_2O_2 /Myoglobin als Radikalbildner;

Fig. 15 zeitabhängige Verschiebung der Fluoreszenzwellenlänge von Ruby nach Zugabe von ABAP (Excitationswellenlänge: 550 nm);

Fig. 16 der Einfluß von unterschiedlichen Troloxmengen

auf den Beginn der zeitabhängige Änderung der Fluoreszenz von Ruby nach Zugabe von ABAP.

Zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von zu untersuchenden Proben werden Mischungen hergestellt, die neben den Proben zumindest ein System, welches temperaturabhängig freie Radikale bildet, und einen Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, enthalten. Diese Mischungen werden durch Pipettierung in Analysengefäße 1 einer an sich bekannten Mikrotiterplatte 2 hergestellt. Eine beispielhafte Probenanordnung der Analysengefäße 1 in einem an sich bekannten 12×8 -Raster der Mikrotiterplatte 2 zeigt Fig. 1. Die Mikrotiterplatte 2 mit den Analysengefäßen 1 wird auf einen Grundkörper 3 form- und kraftschlüssig aufgesetzt. Durch das formnachgiebige Material passen sich die Analysengefäße 1 der Mikrotiterplatte 2 in lagekorrespondierende Vertiefungen 4 des metallischen Grundkörpers 3 ein. Fig. 1 zeigt die Mikrotiterplatte 2 und den Grundkörper 3 zur Veranschaulichung sowohl in separater als auch zusammengesetzter Darstellung. Die Analysengefäße 1 mit den Mischungsansätzen befinden sich zunächst im gekühlten Zustand und werden jeweils, um für alle Mischungsansätze annähernd gleiche thermische Analysenbedingungen zu schaffen, auf eine im wesentlichen gleiche Ausgangstemperatur zwischen 0 und ca. 20°C gebracht. Von dieser Ausgangstemperatur aus werden die Mischungen in den Analysengefäßen 1 gemeinsam gleichmäßig erwärmt. Zu diesem Zweck ist der Grundkörper 3 beheizbar. In Fig. 1 sind deshalb Heizspiralen 5 im Grundkörper 3 angedeutet. Auf Grund der metallischen Ausführung des Grundkörpers 3 und der damit verbundenen guten Wärmeleitung wird dieser, einschließlich der in den Vertiefungen 4 mit engem Wärmekontakt aufgenommenen Analysengefäßen 1, gleichmäßig erwärmt.

Fig. 2 zeigt den Temperaturverlauf der Reaktionsmischung, gemessen mit einem thermochromen Indikatorsystem [Schilling K.; Cumme G. A.; Hoffmann-Blume E.; Hoppe H.; Horn A. Multiwavelength photometry of thermochromic indicator solutions for temperature determination in multicuvettes. Clin-Chem. 39/2, 251-256 (1993)], über einen bestimmten Zeitraum in allen 96 Analysengefäßen 1 (Wells) der Mikrotiterplatte 2. Den zeitlichen Temperaturverlauf von drei ausgewählten Positionen der Mikrotiterplatte (die Positionslagen sind oben rechts in der Abbildung dargestellt) zeigt Fig. 3. Aus der Tabelle in Fig. 3 ist ersichtlich, daß bei einer Ausgangstemperatur von 18°C nach ca. 3 Minuten die Solltemperatur von 42°C erreicht und konstant beibehalten wird.

Erfindungsgemäß werden in den Mischungen durch das radikalbildende System temperaturabhängig freie Radikale gebildet. In den Mischungen ist ferner ein Indikator enthalten, durch den sich in Abhängigkeit dieser Radikalbildung die optischen Eigenschaften der Mischungen ändern. Mit einer an sich bekannten Readeranordnung (nicht in der Zeichnung dargestellt) werden in allen Analysengefäßen die zeitlichen Verläufe dieser Änderung der optischen Eigenschaften erfaßt und folgendermaßen ausgewertet:

Bestimmung der Verzögerungszeit τ

In Fig. 4a ist das Prinzip der Auswertung der Analysenergebnisse durch Bestimmung der Verzögerungszeit τ dargestellt. Die Antioxidanzkapazität A_p der Probe bewirkt im Vergleich zur Antioxidanzkapazität A_0 der Reaktionsmischung ohne Probe eine zeitliche Verzögerung der Ausbildung eines optischen Signals des Indikators, welcher radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert. Die Antioxidanzkapazität A_p der Probe kann über die vergleichsweise mitgeführte Bestimmung der Antioxidanzkapazität

A_S eines Standards normiert werden. Aus dem ansteigenden, nahezu linearen Teil der Kurve des optischen Signals über der Zeit können die Verzögerungszeiten der Probe (τ_p), des Standards (τ_s) und der Reaktionsmischung ohne Probe = Blindwert (τ_0) bestimmt werden. Aus praktischen Gründen ist es vorteilhaft, der Reaktionsmischung eine definierte, kleine Konzentration von Antioxidantien zuzugeben, um sicherzustellen, daß während des nichtlinearen Teils der Radikalbildung zu Beginn der Temperaturerhöhung alle Radikale gebunden werden und der Umschlag des optischen Signals auch im Blindwert im zeitabhängig linearen Teil der Radikalbildung liegt. Die Antioxidanzkapazität A_p der Probe kann dann aus

$$A_p = \left(\frac{\tau_p - \tau_0}{\tau_s - \tau_0} \right) \cdot A_S$$

errechnet werden, wobei sich die Antioxidanzkapazität A_S des Standards aus

$A_S = C_S \cdot SF$ ergibt.

C_S = Konzentration des Standards

SF = Stöchiometriefaktor der Radikalbildung.

Bestimmung des Integrals des optischen Signals

In Fig. 4b ist die Auswertung des Analysenergebnisses über die Bestimmung des Integrals des optischen Signals dargestellt. Es wird das Integral des optischen Signals (Extinktion; Fluoreszenz; Lumineszenz) der Signal-Zeit-Kurve für den Blindwert (I_0) für die Probe (I_p) und für den Standard (I_s) bestimmt. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen I_0/I_p und der Antioxidanzkonzentration (Stern Vollmer Gleichung). Durch Mitführung eines Standards kann auf die Antioxidanzkonzentration in der Probe geschlossen werden.

Die Auswertung der Analysenergebnisse zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität, sowohl durch die Bestimmung der Verzögerungszeit (Fig. 4a) als auch über die Bestimmung des Integrals des optischen Signals (Fig. 4b) wird wesentlich durch geeignete Software auf einem Auswerterechner unterstützt.

Ausführungsbeispiel 1

Colorimetrische Bestimmung der Antioxidanzkapazität

Das radikalbildende System ist 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP). Diese Verbindung produziert schon bei relativ niedrigen Temperaturen eine signifikante Peroxylradikalmenge und reagiert mit allen Substanzen, die als Antioxidantien in biologischen Prozessen eine Bedeutung haben.

Als Indikator, der in Gegenwart von freien Radikalen seine optischen Eigenschaften ändert, wird 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) verwendet. Die ursprünglich farblose Lösung erhält bei Anwesenheit von Radikalen eine intensiv blaue Färbung.

Die zu analysierenden Proben werden in die einzelnen Wells der gekühlten, beheizbaren Mikrotiterplatte pipettiert. Die Belegung der einzelnen Wells der Mikrotiterplatte sind in der Legende von Fig. 5 aufgezeigt. In einigen Wells wird Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat mit bekannter Konzentration und Antioxidanzkapazität als Standard, bzw. Wasser als Blindwert vorgelegt.

Anschließend werden mit einer 96-fach Pipette (Igel) je 200 µl gekühltes, frisch zubereitetes Substrat (1,64 mg ABTS, 54 mg ABAP und 128 µl 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox (376 µM in Was-

ser)), gelöst in 20 ml Puffer (2 ml 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und 18 ml 0,9% NaCl), dazu gegeben, die Mikrotiterplatte geschüttelt, auf 37°C erwärmt und mit einem an sich bekannten Mikrotiterplattenreader bei 620 nm in bestimmten Zeitintervallen und einer Gesamtdauer von im Beispiel angegebenen 43 min vermessen.

Der unterschiedliche Verlauf der Absorption in Abhängigkeit von der Zeit in allen 96 Wells der Mikrotiterplatte wird in Fig. 5 dargestellt. Es zeigt sich in den einzelnen Wells eine deutliche Abstufung der Verzögerungszeit, die bis zum Beginn des Anstiegs der Absorption vergeht. In dieser Zeit werden die gebildeten Radikale von den eingesetzten Antioxidantien "weggefangen", und es kommt zu keiner Änderung der optischen Eigenschaften des ABTS. Die Abhängigkeit der Verzögerungszeit von der Menge des als Referenzantioxidanz eingesetzten Trolox ergibt eine lineare Funktion, wie in der Eichkurve in Fig. 7 dargestellt ist. Der genaue Startpunkt der Reaktion läßt sich durch die Zugabe einer definierten Troloxmenge zur Reaktionslösung genau bestimmen, indem der für den Blindwert erhaltene Zeitpunkt, der nur die Troloxmenge der Reaktionslösung enthält, als Startpunkt der Reaktion betrachtet wird (siehe auch Ausführungsbeispiel 2).

Mit Hilfe der erstellten Eichkurve kann die Antioxidanzkapazität von zu untersuchenden Proben mit der Antioxidanzkapazität von Trolox als Standardwert verglichen werden.

In Fig. 6 wird der Absorptionsverlauf mit der Zeit von unterschiedlichen Mengen am Beispiel von a) Harnsäure und b) Catechin gezeigt. Die Position der einzelnen Wells in der Mikrotiterplatte ist jeweils der Übersichtsdarstellung oben rechts in der Fig. 6 zu entnehmen.

Ausführungsbeispiel 2

Bestimmung der Antioxidanzkapazität mit Chemilumineszenz

Das radikalbildende System ist analog zum ersten Anwendungsbeispiel 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP). Als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, wird Luminol eingesetzt.

Die zu analysierenden Proben werden in die Wells einer gekühlten Mikrotiterplatte pipettiert. In ein oder mehrere Wells wird Wasser oder Natriumchloridlösung (0,9%) gegeben. Diese Wells, die keine Proben enthalten, dienen zur genauen Bestimmung des Startpunkts der Reaktion (Blindwert).

Die Reaktionslösung besteht aus 12,5 ml 0,1 M Glycinpuffer (pH 8,6) mit 15,6 µl 10 mM Luminol und 34 mg ABAP und wird auf eine Temperatur im Bereich von 40 bis 150°C gekühlt.

Zu dieser Lösung werden zuletzt noch 10 bis 20 µl 300 bis 500 µM 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox) gegeben.

100 bis 200 µl obiger Reaktionslösung, welche eine Temperatur zwischen 4°C und 15°C hat, werden zu den Proben in die Wells pipettiert.

Auf Grund der Kühlung von Proben und Reaktionslösung ist kein signifikanter Verbrauch an Antioxidantien zu verzeichnen.

Die Platte wird in einen an sich bekannten Mikrotiterplattenreader gebracht und auf 37°C erhitzt. In einem Zeitraum von 25 Minuten wird in festgelegten Zeitintervallen die Chemilumineszenz des Indikators Luminol gemessen und als willkürliche Lumineszenzeinheiten pro Sekunde (RLU/sec) angegeben. Die Reaktion startet während der Aufheizphase. In dieser Zeit wird das zusätzlich zugegebene Trolox

verbraucht. Das erste Signal erscheint in den Wells mit Blindproben.

Fig. 8 zeigt den zeitlich unterschiedlichen Beginn der Chemilumineszenz in der Gesamtheit der Analysengefäße mit unterschiedlichen, in der Legende beschriebenen Proben. In den Wells B1 bis B6 werden unterschiedliche Mengen 376 μ M Trolox als Referenzantioxidanz, auf den die anderen Proben in ihrer Antioxidanzkapazität bezogen werden, mitgeführt.

Die Meßergebnisse der unterschiedlichen Proben unterscheiden sich sowohl im Zeitpunkt des Beginns der Chemilumineszenz als auch in der Intensität des aufgezeichneten Signals.

Fig. 9 zeigt den Effekt der Zugabe von zusätzlichem Trolox zur Reaktionsmischung für die Bestimmung des exakten Startpunktes der Reaktion. Die obere Kurve H3 wurde ohne Troloxzusatz zur Reaktionslösung erhalten. Sie ist durch einen vergleichsweise flachen Anstieg der Chemilumineszenz vom Zeitpunkt "0" aus charakterisiert, der durch den Temperaturverlauf in der Aufheizphase bedingt ist.

Im Gegensatz dazu enthielten die Kurven G4 und H4 Trolox in der Reaktionsmischung. Bis dieses zusätzliche Trolox "verbraucht" ist, wird erwartungsgemäß keine Chemilumineszenz beobachtet, und die Kurve bewegt sich auf dem "Nullwert".

Zum Zeitpunkt des kompletten Verbrauchs des zusätzlichen Trolox ist die Reaktionstemperatur erreicht, und somit wird ein steiler Anstieg der Chemilumineszenz ermöglicht.

Das zusätzliche Trolox in der Reaktionsmischung ist von praktischer Bedeutung und erleichtert die Auswertung der Meßergebnisse. Es fängt die Radikale zu Beginn der Reaktion weg, wenn noch keine konstante Radikalbildung, auf Grund des Temperaturverlaufs erfolgt. Wenn das Trolox in der Reaktionsmischung verbraucht ist, ist auch die Reaktionstemperatur erreicht und man erhält einen scharfen und präzise auswertbaren Startpunkt der Reaktion.

Ausführungsbeispiel 3

Bestimmung der Antioxidanzkapazität eines Zellsystems (Erythrozyten)

Die colorimetrische Bestimmung der Antioxidanzkapazität eines Zellsystems erfolgt ebenfalls mit 2,2'-Azo-bis-2-aminodipropyl (ABAP) als radikalbildendes System. Die Erythrozytensuspension selbst wird als ein seine optischen Eigenschaften ändernder Indikator genutzt. Die gemessenen Absorptionswellenlängen liegen bei 620 und 550 nm.

Einer Versuchsperson wurden 5 ml Blut mit einer Spritze, die Heparin als Antikoagulant enthält, entnommen und 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (2 000 Xg). Danach wird das Plasma vorsichtig mit einer Pipette abgezogen.

Nach dem Entfernen der Zwischenschicht aus Leukozyten und anderen Zellen werden die verbliebenen Erythrozyten 3 mal mit 15 ml 0,9% NaCl-Lösung gewaschen und zentrifugiert, um noch vorhandenes Plasma vollständig zu entfernen.

40 μ l der Erythrozyten werden zu 10 ml einer Lösung bestehend aus 1 ml 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) und 9 ml 0,9% NaCl-Lösung gegeben. Die Temperatur der Lösung liegt im Bereich zwischen 4°C und 10°C. Diese 0,4% Erythrozytenlösung wird im folgenden "Suspension 1" genannt.

Das Hämolyat wird durch Zugabe von 40 μ l der gewaschenen Erythrozyten zu 10 ml destilliertem Wasser mit einer Temperatur zwischen 4°C und 10°C erhalten und im folgenden als "Suspension 2" bezeichnet.

Als Standardantioxidanz wird 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetra-

methylchroman-2-carbonsäure (Trolox) in einer Konzentration von 6,4 mg in 25 ml 0,9% NaCl-Lösung verwendet.

Die zu untersuchenden Proben werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die Reaktionslösung ("ABAP"), bestehend aus 136 mg ABAP in 3 ml gekühlter 0,9% NaCl-Lösung, muß unmittelbar vor dem Versuch frisch zubereitet und als letztes in die Wells pipettiert werden.

Differenzen der Gesamtvolumina werden durch 0,9% NaCl-Lösung ausgeglichen.

Fig. 10a zeigt die Resistenz von Erythrozyten gegenüber ABAP als zeitabhängigen Verlauf der Absorption bei 620 nm.

In den beiden oberen Kurven (A9 und A10) ist der zeitliche Absorptionsverlauf der Erythrozyten-Suspension mit und ohne Zusatz von ABAP dargestellt. Die Kurve A10 verdeutlicht die Stabilität der reinen Erythrozyten-Suspension ohne Zusatz von ABAP über den gesamten Zeitraum der Messung. Die Kurve A9 stellt die Reaktion von ABAP mit der Erythrozyten-Suspension dar. Durch die vom ABAP freigesetzten Radikale wird die Membran zerstört, die Hämolyse setzt ein, und es erfolgt eine Annäherung an die Kurve A11, welche die Einwirkung von ABAP auf das Hämolyat (Suspension 2) zeigt. Die gebildeten Radikale verursachen die Bildung von Methämoglobin. Die Kurve A12 veranschaulicht dagegen die Stabilität des Hämolyats über den gesamten Zeitraum der Messung.

Fig. 9b und 9c zeigen die Schutzwirkung von Antioxidantien, am Beispiel von Trolox in Form einer später einsetzenden Hämolyse bzw. Methämoglobinbildung.

Wie in Fig. 11 dargestellt, ergibt sich ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Troloxmenge und der Zeit, die bis zum Einsetzen der Hämolyse vergeht.

Ausführungsbeispiel 4

Xanthin-Xanthinoxidase-Luminol-Chemilumineszenz Methode zur Bestimmung von Superoxidradikalfängern

Hypoxanthin und das Enzym Xanthinoxidase bilden Peroxidradikale. Als Indikator wird ebenfalls Luminol verwendet.

Gibt man das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) in die Reaktionslösung, wird die Radikalbildung in Abhängigkeit von der dazugegebenen Menge reduziert und die Intensität der Chemilumineszenz nimmt ab.

In die einzelnen Wells einer gekühlten Mikrotiterplatte werden räumlich getrennt voneinander die unterschiedlichen Proben und je 2 μ l Xanthinoxidase (20 Units/ml in 20 ml 0,9% NaCl) pipettiert. Darauf werden in jedes Analysengefäß jeweils 100 μ l Reaktionslösung, bestehend aus 9 ml 0,1 M Glycinpuffer pH 7,4 mit 1 ml 10 mM Hypoxanthin und 15 μ l 10 mM Luminol, gegeben.

Die Mikrotiterplatte wird in einen an sich bekannten Mikrotiterplattenreader gebracht, geschüttelt sowie auf 37°C erwärmt. In einem Zeitraum von 15 Minuten wird in vorgegebenen Zeitabständen jeweils die Chemilumineszenz gemessen.

In Fig. 12 ist der gemessene Verlauf der Chemilumineszenz in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Wie der Legende zu entnehmen ist, wurden als Standard unterschiedliche Mengen von SOD mit unterschiedlichen Aktivitäten untersucht. Es ist eine deutliche Abnahme der Intensität der Chemilumineszenz bei Proben mit höherer Aktivität gegenüber denen mit niedrigerer Aktivität zu erkennen.

Trägt man in Anlehnung an die Stern-Volmer-Gleichung I_0/I_i , wobei I_0 das Integral der Chemilumineszenz bei Abwesenheit und I_i das Integral der Chemilumineszenz bei Anwesenheit von SOD sind, gegen die SOD-Aktivität auf, erhält

man eine lineare Abhängigkeit. (Fig. 13). Diese kann zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von zu untersuchenden Proben genutzt werden.

Ausführungsbeispiel 5

Reaktion von H_2O_2 mit Myoglobin

Als radikalbildendes System wird H_2O_2 /Myoglobin und als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften (Chemilumineszenz) ändert, Luminol eingesetzt.

Die Reaktionsmischung besteht aus 12,5 ml 0,1 M Glycinpuffer pH 8,6 mit 75 μ l H_2O_2 (6 μ l 30% H_2O_2 auf 10 ml dest. Wasser), 250 μ l Myoglobin (1 mg in 1 ml 0,9% NaCl) und 15,6 μ l 10 mM Luminol.

In die Wells der gekühlten Mikrotiterplatte werden 1 bis 5 μ l der zu untersuchenden Proben bzw. des Standards pipettiert. Dazu werden je 200 μ l der oben genannten Reaktionslösung gegeben und in einem an sich bekannten Mikrotiterplattenreader bei 37°C die Chemilumineszenz gemessen.

Fig. 14 zeigt den zeitlichen Verlauf der Chemilumineszenz in den einzelnen Wells der Mikrotiterplatte. In der Legende sind die Proben im einzelnen benannt.

Die Bestimmung der Antioxidanzkapazität von Proben erfolgt über die gemessene Verzögerungszeit mit einem bekannten Standard, wie z. B. Trolox.

Ausführungsbeispiel 6

Fluorimetrische Bestimmung der Antioxidanzkapazität

Die radikalbildende Substanz ist 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP); als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften (Fluoreszenz) ändert, wird ein Farbstoff, bestehend aus Poly-(benzyl-dimethylvinyl-benzylammoniumchlorid) und Sulforhodamin 101 (Ruby), eingesetzt.

Die Reaktionslösung besteht aus 170 mg ABAP und 100 μ l Ruby als Fluoreszenzindikator in 20 ml Pufferlösung (1 Teil 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4 und 9 Teile 0,9% NaCl) und muß unmittelbar vor der Verwendung frisch zubereitet werden (Temperatur: 4–15°C).

Die zu analysierenden Proben werden in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Zur Blindwertbestimmung wird Wasser oder eine NaCl-Lösung verwendet.

In die einzelnen Wells mit den zu analysierenden Proben werden je 200 μ l der Reaktionslösung pipettiert. Die Platte wird dann sofort in einem an sich bekannten Mikrotiterplattenreader auf 37°C erhitzt, und bei 570 nm wird mit einer Excitationswellenlänge von 550 nm in bestimmten Zeitintervallen die Fluoreszenz gemessen.

Eine Lösung von Ruby in Wasser als Lösungsmittel fluoresziert bei einer Wellenlänge von ca. 604 nm (Excitationswellenlänge: 550 nm). Bei der später betrachteten Wellenlänge von 570 nm ist nur eine geringe Fluoreszenz zu beobachten.

Wie Fig. 15 zeigt, verschiebt sich die Fluoreszenzwellenlänge nach Zugabe von ABAP zeitabhängig in Richtung kleinerer Wellenlängen bei gleichzeitiger Zunahme der Intensität, was auf eine Beeinflussung des Indikators durch ABAP schließen läßt.

Der Beginn der zeitabhängigen Verschiebung der Fluoreszenz läßt sich durch Zugabe von Antioxidantien, wie z. B. Trolox (388 μ M), beeinflussen. Der Einfluß unterschiedlicher Troloxmengen ist in Fig. 16 dargestellt. Die Fluoreszenz wurde bei 570 nm (Excitationswellenlänge: 550 nm) gemessen. Die Abhängigkeit der Zeitverschiebung von der Troloxmenge ergibt einen linearen Zusammenhang (nicht dargestellt) und ist ebenfalls über die Verzö-

gerungszeit zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität von zu untersuchenden Proben geeignet.

Bezugszeichenliste

- 1 Analysengefäße (Wells)
- 2 Mikrotiterplatte
- 3 Grundkörper
- 4 Vertiefungen
- 5 Heizspiralen
- 10 A_p Antioxidanzkapazität der Probe
- A_0 Antioxidanzkapazität der Reaktionsmischung ohne Probe
- A_s Antioxidanzkapazität eines Standards
- 15 τ Verzögerungszeit
- τ_p Verzögerungszeit der Probe
- τ_s Verzögerungszeit des Standards
- τ_0 Verzögerungszeit der Reaktionsmischung ohne Probe
- C_s Konzentration des Standards
- 20 SF Stöchiometriefaktor der Radikalbildung
- I_0 Integral des optischen Signals für die Reaktionsmischung ohne Probezusatz
- I_p Integral des optischen Signals für die Probe
- I_s Integral des optischen Signals für Standard

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung der Antioxidanzkapazität in Proben, **dadurch gekennzeichnet**, daß mit den Proben in einer Pluralität von in einem vorgegebenen x-y-Raster angeordneten gekühlten Analysengefäßen Mischungen hergestellt werden, die weiterhin jeweils
 - a) aus zumindest einem System, welches temperaturabhängig freie Radikale bildet, und
 - b) aus zumindest einem Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert,
 bestehen, daß die Mischungen in den gekühlten Analysengefäßen zunächst auf eine im wesentlichen gleiche Analysen-Ausgangstemperatur zwischen 0 und ca. 20°C gebracht und anschließend, vorzugsweise in einem Zeitraum von bis zu 60 min., gleichmäßig auf eine Temperatur bis höchstens ca. 90°C erwärmt werden, daß während der Erwärmung der Mischungen in den Analysengefäßen mit einer an sich bekannten Readeranordnung in den Mischungen der zeitliche Verlauf der Änderung der optischer Eigenschaften erfaßt wird, und daß aus dieser Änderung die Antioxidanzkapazität durch Vergleich mit bekannten Referenzwerten bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest in einem der Analysengefäße eine Substanz mit definierter Antioxidanzkapazität in einer Referenzmischung der gleichen Temperaturerhöhung ausgesetzt wird wie die in ihrer Antioxidanzkapazität zu bestimmenden Mischungen und daß die Antioxidanzkapazität der zu bestimmenden Mischungen über die Änderung deren optischer Eigenschaften im Vergleich zur Änderung der optischer Eigenschaften in der Referenzmischung ermittelt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als temperaturabhängig freie Radikale bildendes System 2,2'-Azo-bis-2-amidinopropan (ABAP) verwendet wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das temperaturabhängig freie Radikale bildende System der Mischungen aus Xanthinoxidase mit Hypoxanthin als Substrat gebildet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,

net, daß als temperaturabhängig freie Radikale bildendes System H_2O_2 eingesetzt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, Luminol verwendet wird. 5

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) verwendet wird.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, eine Erythrozytensuspension verwendet wird. 10

9. Verfahren nach den Ansprüchen 1, 3 und 6 bzw. 7 dadurch gekennzeichnet, daß in allen Reaktionsmischungen eines Analysenansatzes eine definierte im Vergleich zur Probe und dem Standard kleine Antioxidanzkonzentration eingestellt wird. 15

10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Indikator, der radikalabhängig seine optischen Eigenschaften ändert, Poly-(benzyltrimethylvinylbenzylammoniumchlorid) und Sulforhodamin 101(Ruby) verwendet wird. 20

11. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur der Mischungen sprunghaft erhöht wird. 25

12. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur der Mischungen kontinuierlich erhöht wird.

13. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur der Mischungen mit konkaver Temperatur-Zeitfunktion erhöht wird. 30

14. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur der Mischungen mit konvexer Temperatur-Zeitfunktion erhöht wird. 35

15. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die im x-y-Raster einer an sich bekannten Mikrotiterplatte (2) angeordneten Analysengefäße (1) aus formnachgiebigem Material bestehen, das kraft- und formschlüssig in einen metallischen, die Analysengefäße (1) als lagekorrespondierende Vertiefungen (4) aufweisenden sowie temperierbaren Grundkörper (3) eingesetzt ist. 40

16. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Grundkörper (3) im thermischen Kontakt mit Mitteln (5) zu deren Temperierung steht. 45

17. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur Temperierung des Grundkörpers (3) aus elektrischen Heizelementen, beispielsweise einer oder mehreren im oder am Grundkörper (3) angebrachten Heizspiralen (5), bestehen. 50

18. Vorrichtung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur Temperierung des Grundkörpers (3) aus fluiden Medien, z. B. Wasser, welches den Grundkörper (3) durchströmt, bestehen. 55

19. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß für colorimetrische Messungen an den Mischungen die Analysengefäße (1) aus lichtdurchlässigem Material bestehen und die Vertiefungen (4) im Grundkörper (3) als durchgängige Bohrungen ausgeführt sind. 60

Hierzu 16 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

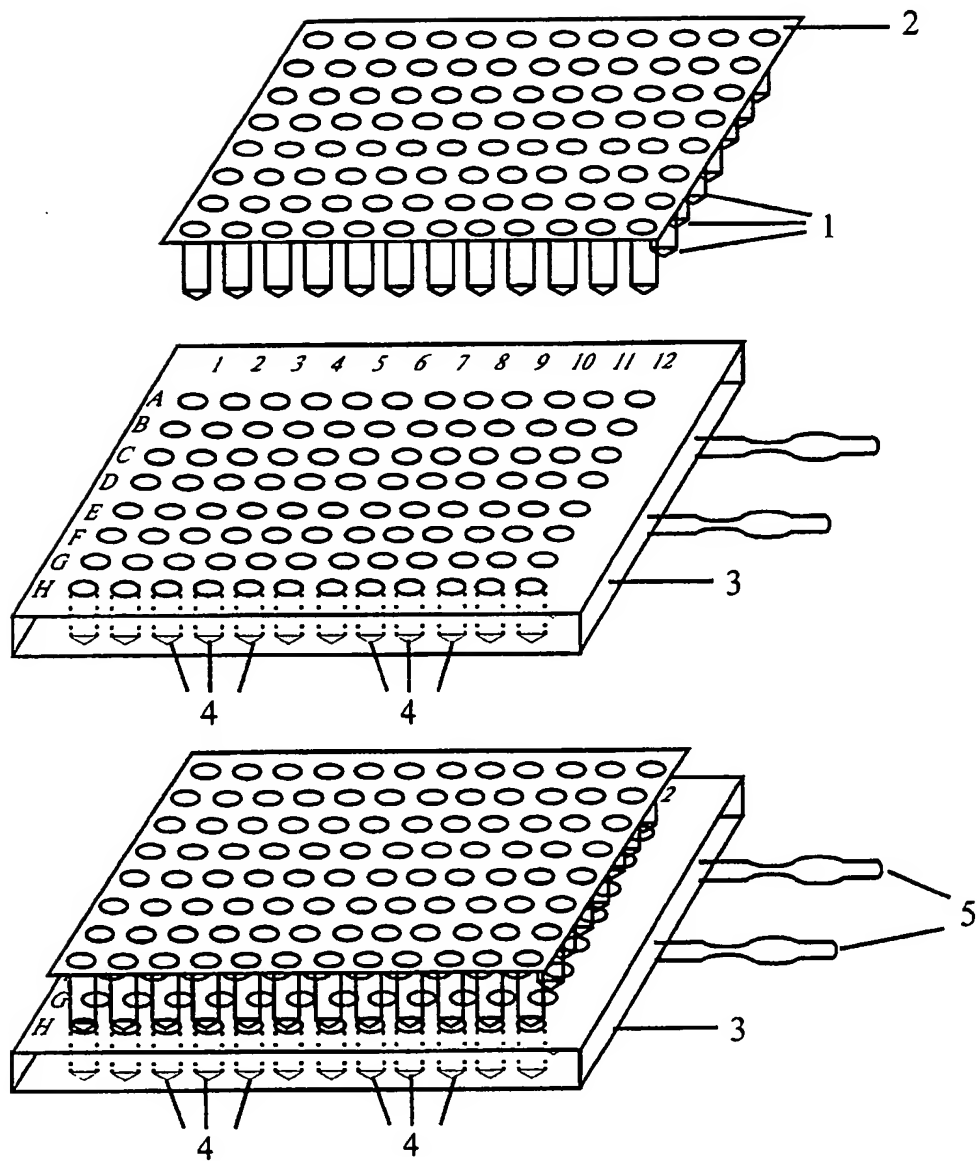


Fig. 1

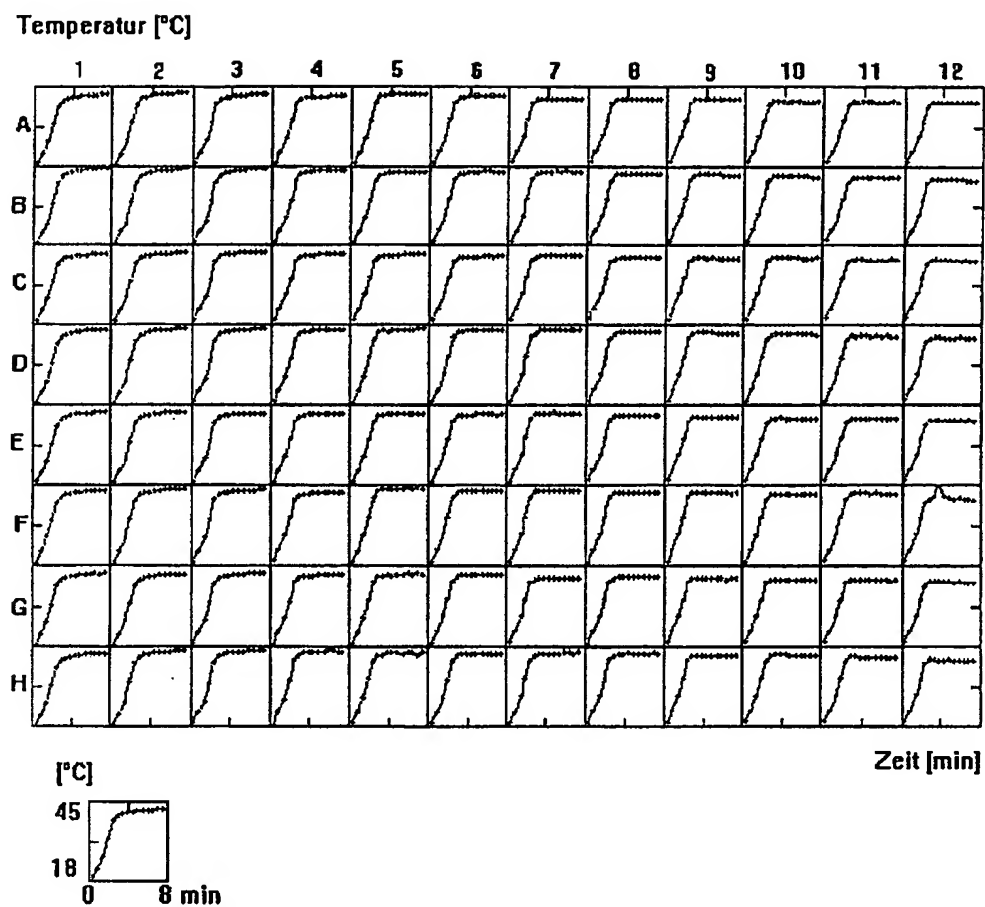
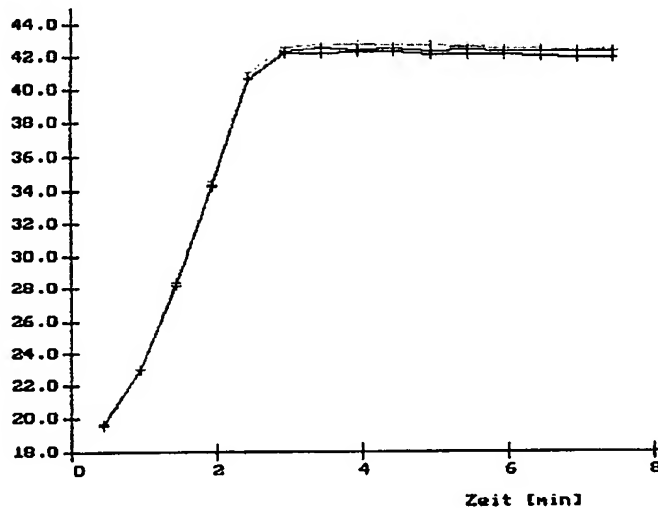


Fig. 2

Zyklus	Zeit	T
	[min]	[°C]
1	0.4	19.68
2	0.9	22.95
3	1.5	28.35
4	2.0	34.25
5	2.5	40.61
6	3.0	42.25
7	3.5	42.50
8	4.0	42.39
9	4.4	42.45
10	4.9	42.28
11	5.4	42.32
12	5.9	42.25
13	6.4	42.28
14	6.9	42.24
15	7.4	42.25

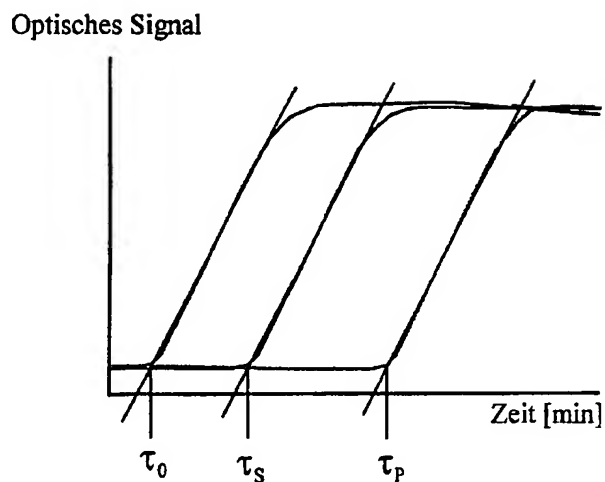
Temperatur [°C]



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Fig. 3

a) Bestimmung der Verzögerungszeit

 τ_0 Verzögerungszeit des Blindwerts τ_s Verzögerungszeit des Standards τ_p Verzögerungszeit der Probe

b) Bestimmung des Integrals des optischen Signals

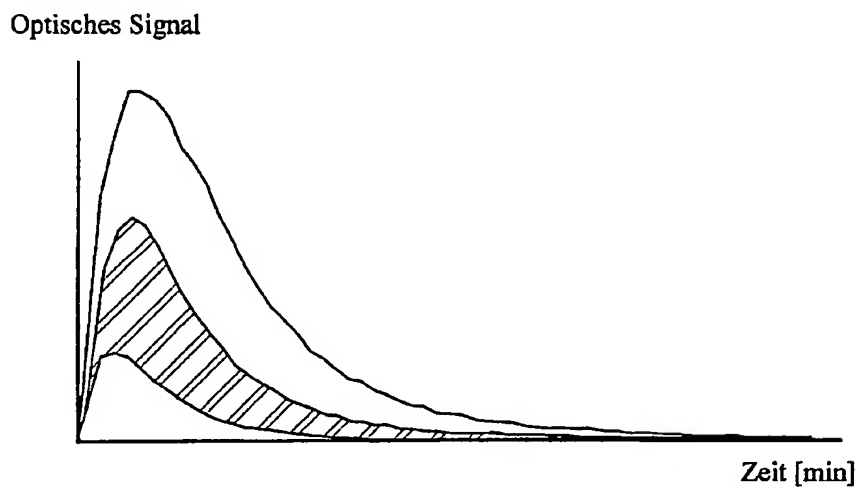
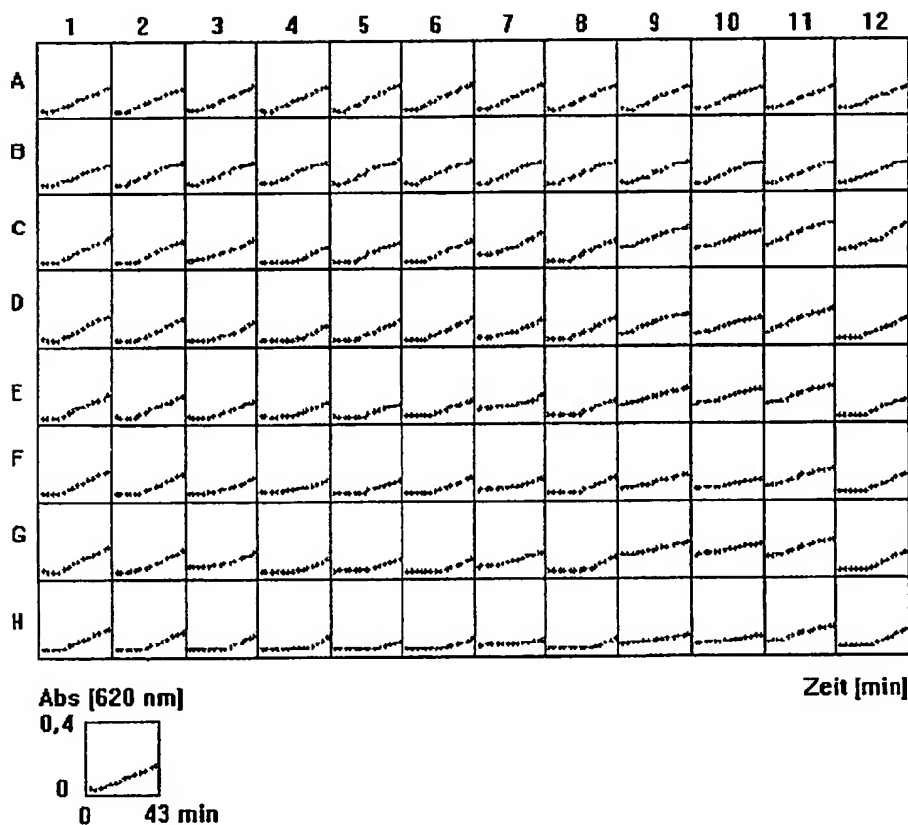
☐ Blindwert = I_0 ☐ Standard = I_s ☐ Probe = I_p

Fig. 4

Absorbanz bei 620 nm



Legende:

A1-B12: ohne Zusatz (Blindproben)
 C1-E1: 3 µl Trolox (376 µM)
 F1-H1: 5 µl Trolox (376 µM)
 C2-E2: 7 µl Trolox (376 µM)
 F2-H2: 9 µl Trolox (376 µM)
 C3-E3: 11 µl Trolox (376 µM)
 F3-H3: 13 µl Trolox (376 µM)
 C4-E4: 15 µl Trolox (376 µM)
 F4-H4: 17 µl Trolox (376 µM)
 C5-D5: 1 µl Catechin (200 µM)
 E5-F5: 2 µl Catechin (200 µM)
 G5-H5: 3 µl Catechin (200 µM)
 C6-D6: 1 µl Propylgallat (200 µM)
 E6-F6: 2 µl Propylgallat (200 µM)
 G6-H6: 3 µl Propylgallat (200 µM)
 C7-D7: 1 µl Bilirubin (400 µM)
 E7-F7: 1 µl Bilirubin (400 µM)
 G7-H7: 1 µl Bilirubin (400 µM)

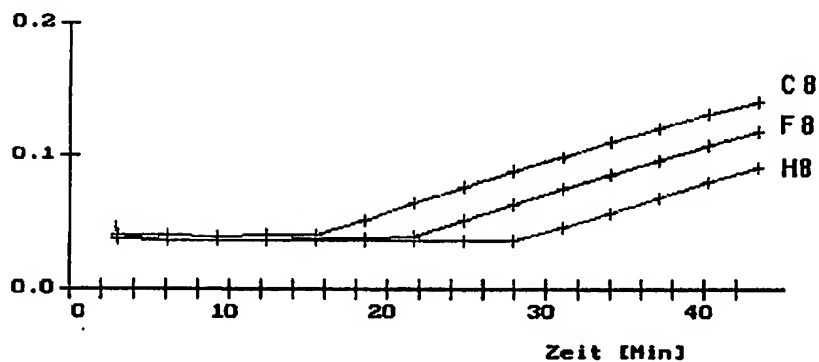
C8-D8: 1 µl Harnsäure (400 µM)
 E8-F8: 2 µl Harnsäure (400 µM)
 G8-H8: 3 µl Harnsäure (400 µM)
 C9-D9: 1 µl Albumin (5%)
 E9-F9: 2 µl Albumin (5%)
 G9-H9: 3 µl Albumin (5%)
 C10-E10: 1 µl Serum (unverdünnt)
 F10-H10: 2 µl Serum (unverdünnt)
 C11-D11: 5 µl Serum (1:10 verdünnt)
 E11-F11: 8 µl Serum (1:10 verdünnt)
 G11-H11: 10 µl Serum (1:10 verdünnt)
 C12-D12: 1 µl Ascorbinsäure (400 µM)
 E12-F12: 2 µl Ascorbinsäure (400 µM)
 G12-H12: 3 µl Ascorbinsäure (400 µM)

Fig. 5

a) Harnsäure

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Absorbanz



b) Catechin

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Absorbanz

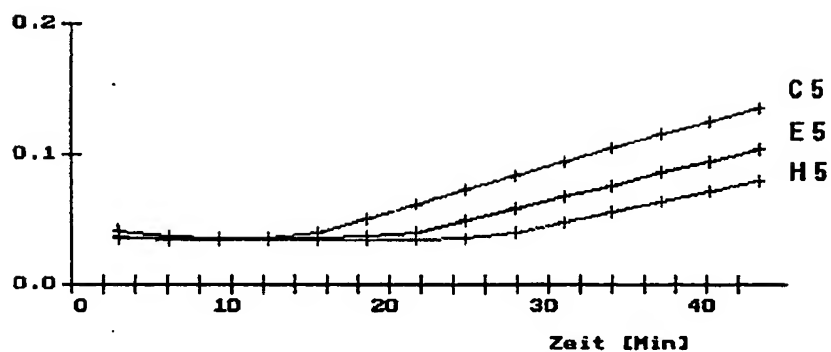


Fig. 6

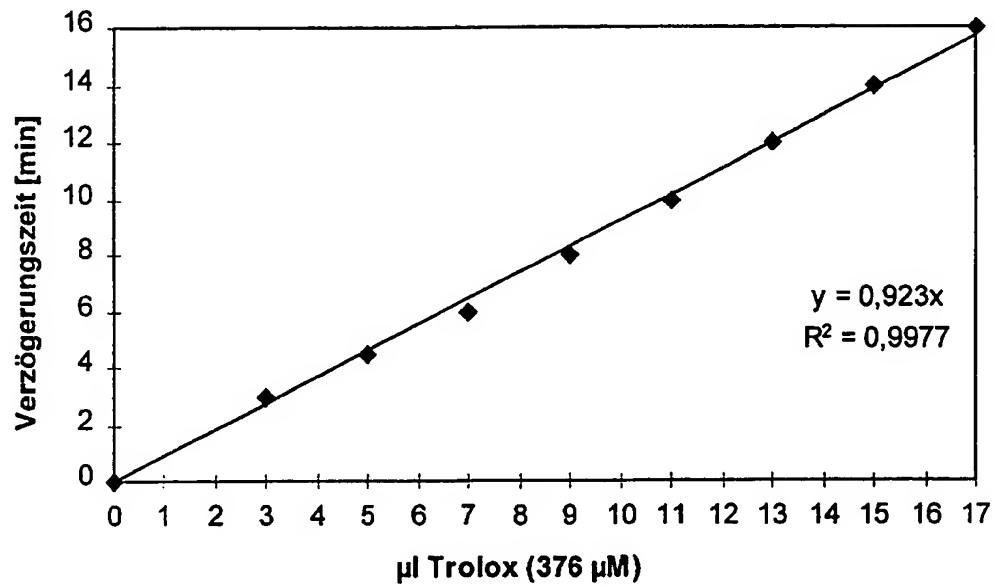
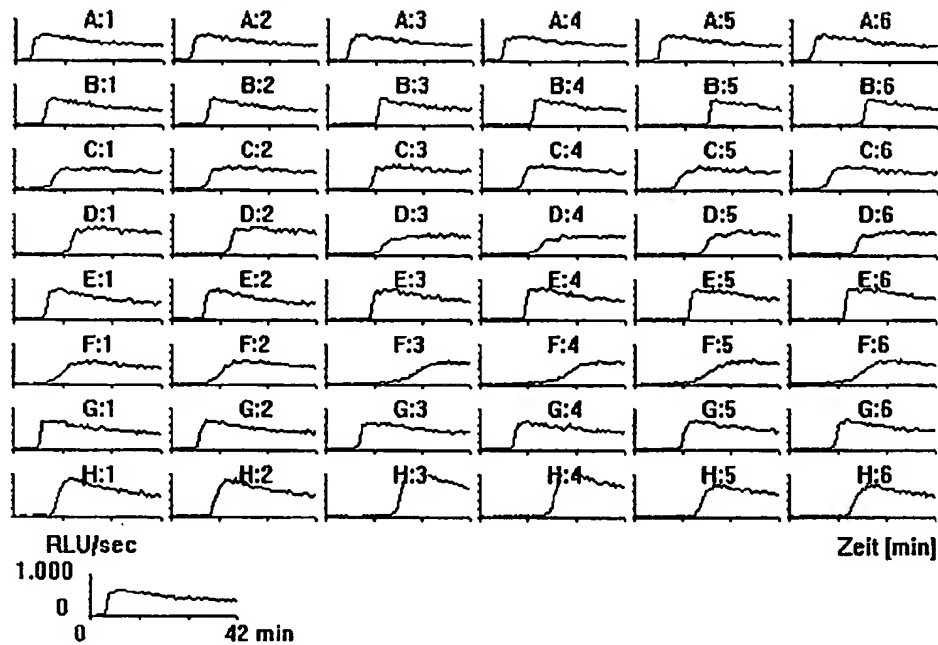


Fig. 7

Chemilumineszenz [RLU/sec]



Legende:

- A1 - A6: 1 - 10 µl Wasser als Blindwert
 B1 - B2: 0,5 µl Trolox (376 µM)
 B3 - B4: 1 µl Trolox (376 µM)
 B5 - B6: 2 µl Trolox (376 µM)
 C1 - C2: 1 µl Serum von Patient A der Intensivstation
 C3 - C4: 1 µl Serum von Patient B der Intensivstation
 C5 - C6: 1 µl Serum von Patient C der Intensivstation
 D1 - D2: 1 µl Serum einer gesunden Vergleichsperson
 D3 - D4: 2 µl Serum von Patient D der Intensivstation
 D5 - D6: 2 µl Serum von Patient E der Intensivstation
 E1 - E2: 1 µl Ascorbinsäure (400 µM)
 E3 - E4: 2 µl Ascorbinsäure (400 µM)
 E5 - E6: 2,7 µl Ascorbinsäure (400 µM)
 F1 - F2: 2 µl Portugiesischer Rotwein 1:100 mit Wasser verdünnt
 F3 - F4: 4 µl Portugiesischer Rotwein 1:100 mit Wasser verdünnt
 F5 - F6: 4 µl Italienischer Rotwein 1:100 mit Wasser verdünnt
 G1 - G2: 7 µl mit Urin kontaminiertes Wasser (1:100)
 G3 - G4: 10 µl mit Urin kontaminiertes Wasser (1:500)
 G5 - G6: 10 µl mit Urin kontaminiertes Wasser (1:200)
 H1 - H2: 1 µl Bilirubin (400 µM)
 H3 - H4: 2 µl Bilirubin (400 µM)
 H5 - H6: 1,5 µl Propylgallat (200 µM)

Fig. 8

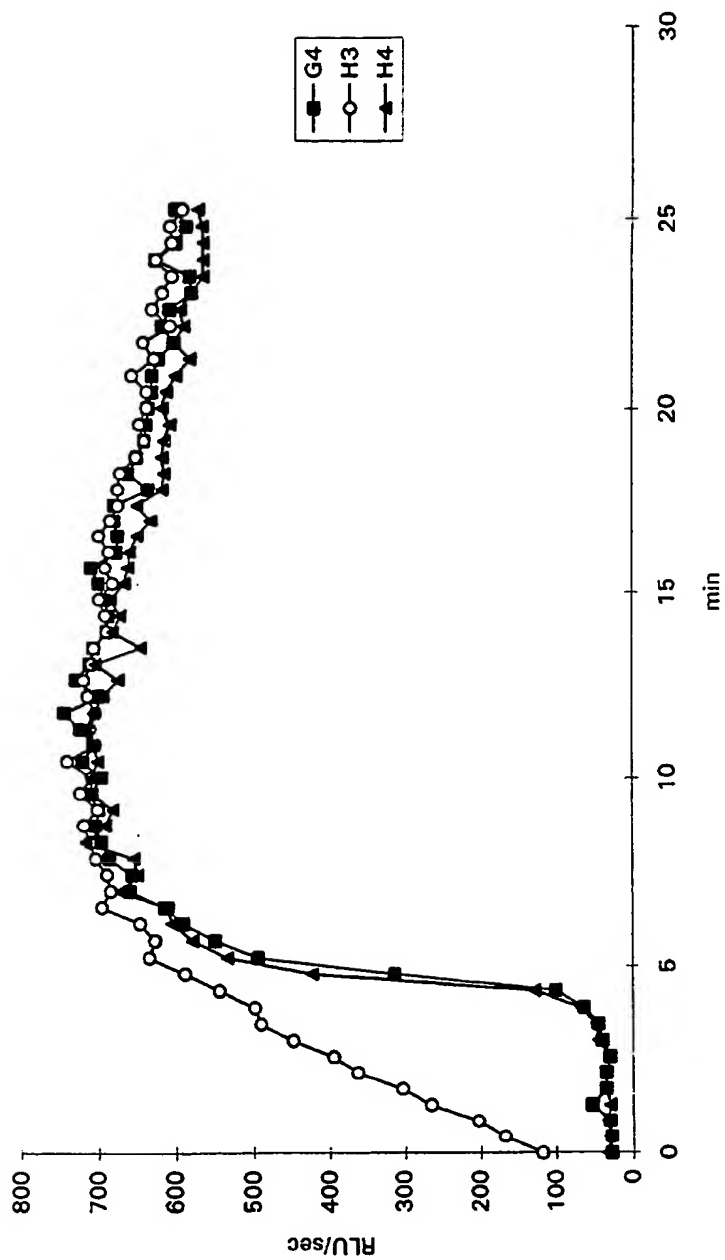
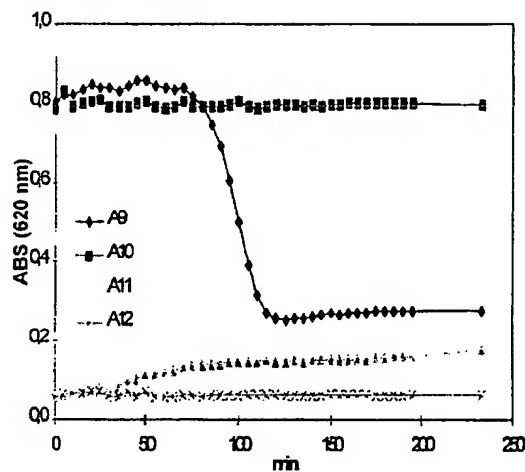


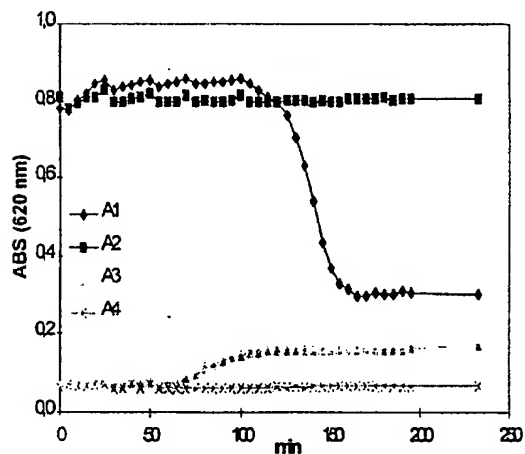
Fig. 9

a) ohne Zusatz

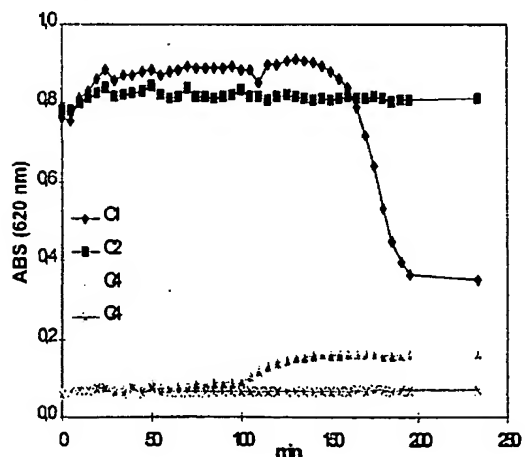


Legende:

- A9: 40 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 1
 40 μ l ABAP
 A10: 40 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 1
 40 μ l NaCl - Lösung
 A11: 40 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 2
 40 μ l ABAP
 A12: 40 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 2
 40 μ l NaCl - Lösung

b) Zugabe von 10 μ l Trolox

- A1: 10 μ l Trolox und 30 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 1
 40 μ l ABAP
 A2: 10 μ l Trolox und 30 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 1
 40 μ l NaCl - Lösung
 A3: 10 μ l Trolox und 30 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 2
 40 μ l ABAP
 A4: 10 μ l Trolox und 30 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 2
 40 μ l NaCl - Lösung

c) Zugabe von 20 μ l Trolox

- C1: 20 μ l Trolox und 20 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 1
 40 μ l ABAP
 C2: 20 μ l Trolox und 20 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 1
 40 μ l NaCl - Lösung
 C3: 20 μ l Trolox und 20 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 2
 40 μ l ABAP
 C4: 20 μ l Trolox und 20 μ l NaCl - Lösung
 160 μ l Suspension 2
 40 μ l NaCl - Lösung

Fig. 10

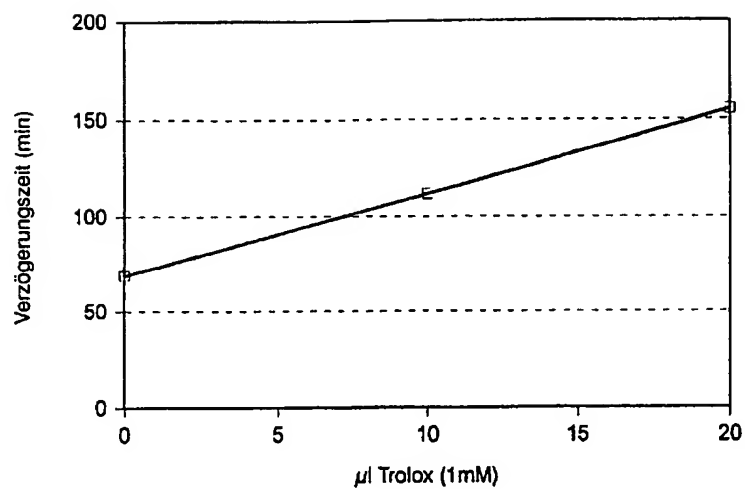
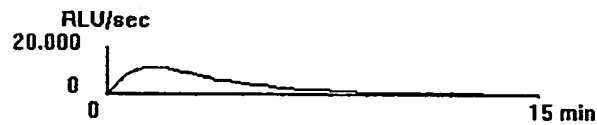
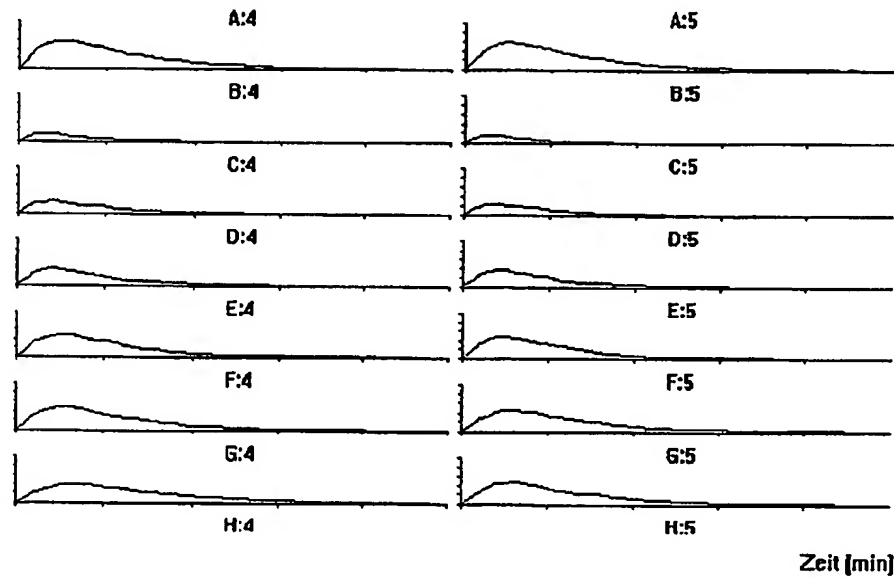


Fig. 11

Chemilumineszenz [RLU/sec]



Legende:

A4 und A5	2 µl NaCl-Lösung
B4 und B5	2 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 96 mUnits/ml
C4 und C5	1 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 96 mUnits/ml
D4 und D5	2 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 24 mUnits/ml
E4 und E5	2 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 9,6 mUnits/ml
F4 und F5	1 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 9,6 mUnits/ml
G4 und G5	0,5 µl Superoxid-Dismutase (SOD): 9,6 mUnits/ml
H4 und H5	2 µl Serum gelöst in 0,9 % NaCl-Lösung 1:50

Fig. 12

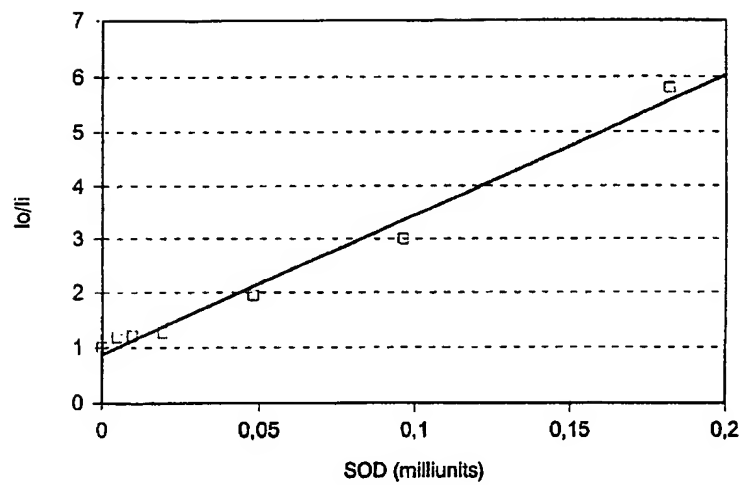
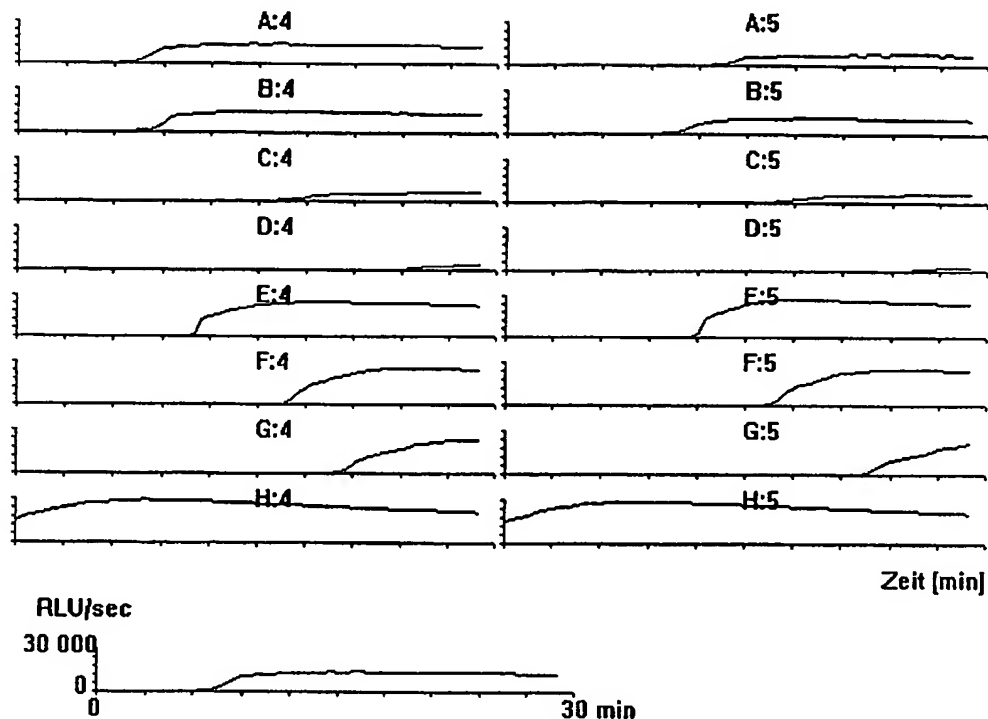


Fig. 13

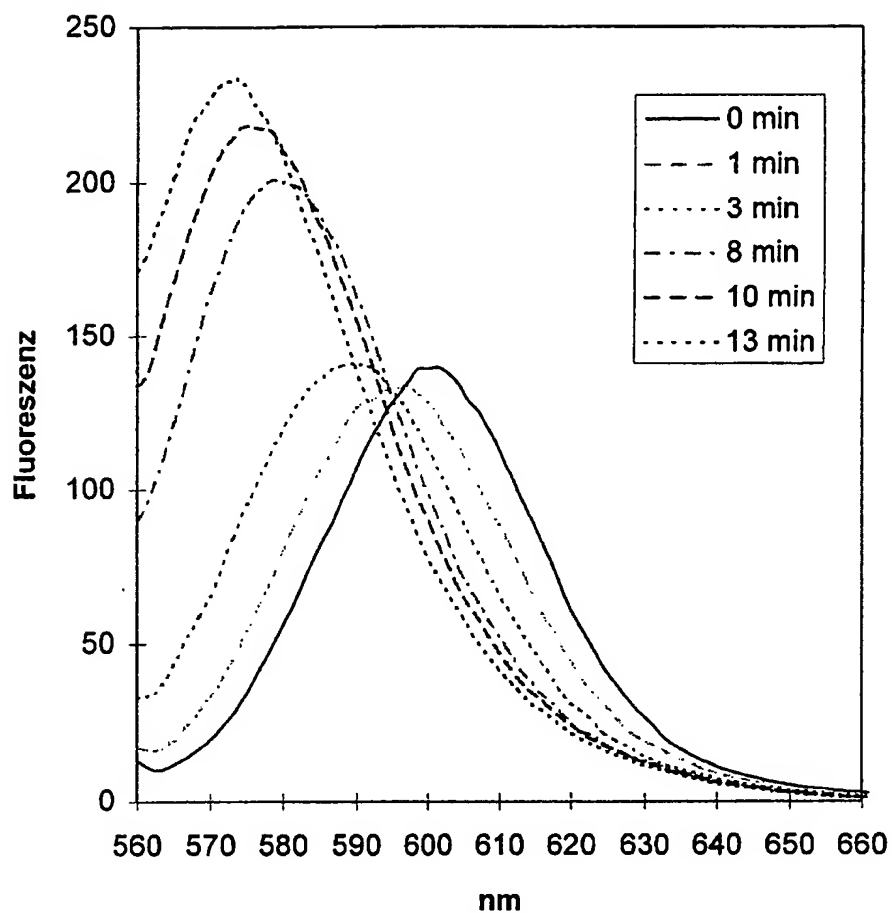
Chemilumineszenz [RLU/sec]



Legende:

- A4: 1 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K1
- A5: 1 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K2
- B4: 1 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K3
- B5: 1 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K4
- C4: 2 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K5
- C5: 2 µl Blutserum einer gesunden Vergleichsperson K5
- D4: 2 µl Blutserum eines Patienten mit einer Nierenerkrankung P1
- D5: 2 µl Blutserum eines Patienten mit einer Nierenerkrankung P2
- E4: 1 µl Trolox (388 µM)
- E5: 1 µl Trolox (388 µM)
- F4: 1,5 µl Trolox (388 µM)
- F5: 1,5 µl Trolox (388 µM)
- G4: 2 µl Trolox (388 µM)
- G5: 2 µl Trolox (435 µM)
- H4: 2 µl NaCl (0,9%)
- H5: 2 µl NaCl (0,9%)

Fig. 14



$\lambda_{exc}=550 \text{ nm}$

Fig. 15

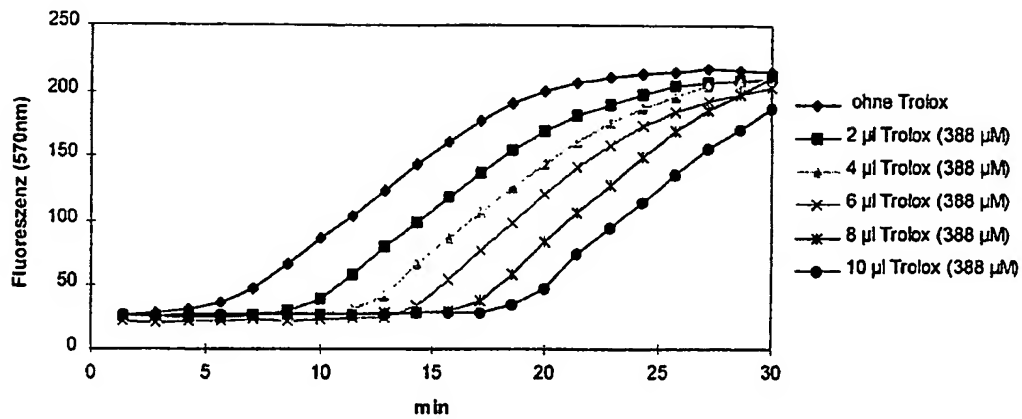
 $\lambda_{exc}=550 \text{ nm}$

Fig. 16